

**ÉTUDE DES PROTÉINES
DU FLUIDE GINGIVAL**

THÈSE

présentée

à l'Université Claude-Bernard - LYON

et soutenue publiquement le 14 Novembre 1972

pour obtenir le grade de Docteur en Chirurgie Dentaire

par

William GOLDBERG

né le 3 Février 1938

à LYON (3°)



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552607_0037

UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD - LYON I

Année 1972 - N°

ÉTUDE DES PROTÉINES DU FLUIDE GINGIVAL

THÈSE

présentée

à l'Université Claude-Bernard - LYON

et soutenue publiquement le 14 Novembre 1972

pour obtenir le grade de Docteur en Chirurgie Dentaire

par

William GOLDBERG

né le 3 Février 1938

à LYON (3°)

UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD

- Président de l'Université : J. BOIDIN
- Premier Vice-Président : R. TOURAINÉ

Secrétaire Général : M. IZAUTE

Unités d'Enseignement et de Recherche de l'Université

- Médecine - Grange-Blanche - Directeur : Professeur GERMAIN D.
Alexis-Carrel - Directeur : Professeur GIROD C.
Sud-Ouest - Directeur : Professeur TOLOT F.
Lyon-Nord - Directeur : Professeur BERTOYE A.
- Biologie Humaine - Directeur : Docteur CZYBA R. (Maître de
Conférences Agrégé).
- Techniques de Réadaptation - Directeur : Professeur MOUNIER-
KUHN P.
- Sciences Pharmaceutiques - Directeur : M. CARRAZ M. (Maître
de Conférences Agrégé).
- Sciences Odontologiques - Directeur : Docteur R. VINCENT.
- Institut Régional d'Education Physique et Sportive - Directeur :
Professeur R. GUILLET.
- Mathématiques - Directeur : Doyen BRACONNIER.
- Physique - Directeur : Professeur DUFAY.
- Chimie et Biochimie - Directeur : Professeur GAUTHERON
- Sciences de la Nature - Directeur : Professeur DAVID L.
- Biodynamique et Psychopédagogie - Directeur : Professeur CHANEL J.
- Institut Universitaire de Technologie n° 1 - Directeur :
Professeur FEUVRAIS L.
- Institut Universitaire de Technologie n° 2 - Directeur :
Professeur CALLET, Directeur ENSAM.
- Observatoire - Directeur : Professeur BIGAY J.H.
- Physique nucléaire - Directeur : Professeur SARRAZIN A.

EXAMINATEURS DE LA THESE :

Président : Monsieur le Professeur A. BERTOYE

Assesseurs : Monsieur le Professeur Agrégé F. de MOURGUES

Monsieur le Docteur R. VINCENT

Monsieur le Docteur Y. MANUEL

Monsieur le Professeur G. CIMASONI.

A
A mon père et à ma mère,

A ma femme,

A ma fille SYLVIE, A mon fils GILLES

Au personnel du service de Stomatologie de l'Hôpital de la
Croix-Rousse de LYON,

Au personnel du laboratoire des protéines de l'Institut
Pasteur de LYON,

A tous ceux qui me sont chers.

A Monsieur le Professeur BERTOYE,

Il a bien voulu accepter d'être notre Président de Thèse malgré le travail supplémentaire que cela lui apportait au milieu de ses nombreuses activités à l'Hôpital, à l'Institut Pasteur et à la direction de l'U.E.R. LYON-NORD.

Il a été d'accord, dès le début de notre travail, pour nous ouvrir les portes de l'Institut Pasteur et il a accepté de nous recevoir de nombreuses fois pour nous orienter et nous conseiller tout au long de ce travail.

Qu'il veuille bien accepter ici l'assurance de notre profond respect et de notre reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Agrégé F. de MOURGUES,

A l'occasion de cette Thèse, nous tenons à lui dire la profonde reconnaissance que nous lui témoignons, lui qui est depuis plus de dix ans notre maître à penser dans la vie professionnelle et qui sait aussi nous orienter dans la vie privée.

Son immense culture, sa brillante intelligence ont toujours été pour nous des sujets d'admiration.

Qu'il sache que notre attachement lui est entier.

A Monsieur le Docteur R. VINCENT,

Nous avons déjà eu l'occasion d'apprécier la clarté de son intelligence quand il a été notre professeur à l'Ecole Dentaire de LYON.

Nous tenons à le remercier d'avoir accepté d'être notre juge à l'occasion de cette thèse.

A Monsieur le Professeur CIMASONI,

Nous sommes allé chercher auprès de lui de nombreux conseils et directives étant donné la grande connaissance qu'il a dans le domaine de la parodontologie.

Nous espérons que la collaboration que nous lui avons demandée servira à rapprocher encore plus les deux écoles d'odontologie suisse et lyonnaise.

A Monsieur le Docteur MANUEL,

Sans lui cette thèse ne serait pas.

Il nous a reçu très amicalement dans son laboratoire à l'Institut Pasteur de LYON et, au milieu de ses activités nombreuses de Chef de service, il a bien voulu consacrer un temps précieux à s'occuper de nos travaux.

Qu'il veuille bien accepter notre reconnaissance et, nous l'espérons, notre amitié.

ETUDE DES PROTEINES DU FLUIDE GINGIVAL

Le fluide gingival se présente comme un liquide qui s'écoule du sillon gingivo-dentaire en quantité d'ailleurs plus importante quand il existe des maladies parodontales.

Aussi il nous a semblé intéressant de présenter un travail concernant ce liquide physiologique, qui a d'ailleurs intéressé de nombreux auteurs auparavant.

H I S T O R I Q U E

Le premier, SERRES, en 1817, parla du fluide gingival et il pensa que le tartre était dû à la sécrétion de glandes noyées dans la gencive. (86)

En 1920, G.V. BLACK (8) estima, pour sa part, que les structures décrites par SERRES n'étaient pas du tout glandulaires, mais plutôt que les calculs sous-gingivaux étaient produits par le sérum qui se déchargeait dans le cul-de-sac gingival et il pensa que, plus l'irritation de la gencive était grande, plus les quantités importantes de sérum se déchargeaient dans le cul-de-sac gingival.

STILLMAN et M. CALL (88 bis) pensèrent que le rôle de la gencive entourant les dents était de déverser une sécrétion qui a pour rôle de nettoyer la surface des dents.

Mc CALL affirma que le fluide était un exsudat sanguin; dans le cas de gencives saines, il estimait que le fluide avait une réaction alcaline et, dans le cas d'une inflammation gingivale, la réaction était acide.

BOEDEKER (8 bis), examinant histologiquement des échantillons de tissus gingivaux, ne vit aucune structure glandulaire; il suggéra que le fluide n'était pas une sécrétion mais un exsudat inflammatoire.

Plus récemment, WAERHAUG décréta que "au niveau de tous sillons gingivaux dentaires, il existe un écoulement constant d'éléments cellulaires et de tissus fluides". (105)

La quantité de fluide gingival est peu importante en l'absence d'inflammation et augmente en fonction de l'inflammation.

Il montra que l'écoulement du fluide gingival était capable de rejeter des traces d'encre de chine insérées dans des sillons gingivaux sains. Il en conclut donc que l'extériorisation du fluide est plus rapide que l'introduction de la salive dans le sillon gingivo-dentaire. Il montra aussi que des traces de teinture incluses dans la salive ne pénétraient pas sous le sillon gingival. En conclusion, il affirma que les dépôts de tartre sous-gingivaux étaient d'origine sanguine (104).

Enfin, depuis une dizaine d'années, des travaux importants ont été faits sur cette question, notamment dans les Ecoles Scandinaves et Américaines.

Ainsi BRILL et KRASSE, en 1958, (15) firent des expérimentations sur les chiens : des injections intraveineuses de fluorescéine furent effectuées à des chiens avec des sillons gingivo-dentaires sains. Le fluide gingival fut ensuite collecté au moyen de minces bandes de papier filtre placées dans le sillon gingivo-dentaire. La présence de fluorescéine fut mise en évidence dans plus de 90 % des cas; ceci mettait en évidence le passage des composants sanguins au niveau du sillon gingivo-dentaire.

Par ailleurs, la présence de la fluorescéine ne fut pas décelée sur les autres épithéliums de la bouche, sauf aux endroits où la gencive était blessée et à la place où une dent était en train de faire son éruption.

BRILL et BJORN, en 1959 (17) aussi, étendirent les précédentes recherches sur le matériel humain.

Deux heures après l'administration per os de fluorescéine de Sodium, on a constaté la présence de fluorescéine dans la plupart des culs-de-sac gingivaux et ceci dans 90 % des cas, indiquant ainsi le passage des protéines plasmatiques à l'intérieur du cul-de-sac gingival.

Comme dans les expériences précédentes, des bandes de papier filtre absorbaient le fluide.

Chez quelques sujets, on a pu déceler la présence de fluorescéine au niveau de la muqueuse pituitaire. Il est apparu par ailleurs que tant la muqueuse pituitaire que celle du cul-de-sac gingival produisaient^{de} plus grandes quantités de liquide fluorescent dans les cas où elles étaient enflammées.

Il a été impossible de mettre en évidence la perméabilité à la fluorescéine au niveau d'autres muqueuses de la cavité buccale.

BRILL, pour étudier la physiologie du fluide gingival, examina la perméabilité des capillaires au niveau du sillon gingival. Pour cela, il injecta du "Bleu Evans" à des jeunes chiens.(14). Cette teinture a la propriété de se lier aux protéines plasmatiques et ne passe pas le mur de la perméabilité capillaire quand celle-ci est au repos.

BRILL s'aperçut que des strips placés au niveau des culs-de-sac gingivaux étaient imprégnés par la teinture quand ces culs-de-sac étaient enflammés. L'inflammation était provoquée par des procédés mécaniques ou par des injections de faible concentration d'histamines intraveineuses. Il en conclut donc que la perméabilité capillaire était en étroite relation avec l'écoulement du fluide gingival.

BRILL et BRONNESTAN étudièrent, les premiers, les protéines du fluide gingival (20). Ils utilisèrent des procédés immuno-électrophorétiques pour étudier le fluide gingival recueilli au moyen de papier filtre. Cette méthode a montré que le liquide contient au moins 6 groupes de protéines sériques. Le point le plus important a été la mise en évidence de la présence de :

- sidérophiline
- albumine
- gamma I globuline
- gamma II globuline
- bêta globuline.

La présence de ces protéines montrèrent que des protéines de poids moléculaire élevé pouvaient passer dans le manchon épithélial.

Les auteurs émirent l'idée que l'importance des gamma globulines pouvaient jouer un rôle d'anticorps protecteur; mais cette idée fut combattue plus tard par des auteurs américains comme WALLACE MANN (65) qui démontra que le pourcentage des gamma globulines était identique dans le sérum et le fluide gingival. Nous verrons dans nos conclusions les hypothèses que nous avons formulées concernant cette question.

BRILL, en 1960, (21) mit en évidence le rapport entre l'inflammation de la gencive et l'augmentation du flux du fluide gingival.

Pour ce faire, il s'est servi de chiens d'expérience. Les uns nourris avec des aliments mous avaient une santé gingivale précaire, les autres nourris avec des aliments durs, donc favorisant la circulation par leurs massages, avaient des gencives plus saines.

Dans une première partie de son exposé, il montra, grâce à des injections de fluorescéine, que le fluide gingival était plus abondant chez les chiens nourris avec le régime aliments mous et pâteux.

Dans une deuxième partie, des coupes histologiques montrèrent aussi que l'inflammation était plus importante dans la catégorie des chiens nourris avec des aliments mous. Il suggéra donc qu'il est possible de refléter le degré d'inflammation dans un cul-de-sac donné par la quantité de l'écoulement du fluide gingival du même cul-de-sac.

En 1962, BRILL détermina, grâce à la méthode de la fluorescéine, que l'écoulement du fluide gingival s'effectuait au niveau de sillons gingivaux parfaitement sains. (22).

Ce point de vue fut contesté quelques années plus tard par LOE et ses collaborateurs qui estimaient qu'il était impossible de collecter du fluide gingival de parodontes en parfaite santé. Les résultats contradictoires de ces deux séries d'hypothèses n'ont pas encore été tranchés.

En 1962, GUSTAFON et NILSON étudièrent l'activité fibrinolytique du fluide gingival (46).

LOE étudia, pour sa part, les composants cellulaires du fluide gingival(60); les résultats montrèrent que les poches gingivales contenaient des cellules desquamées et des polynucléaires neutrophiles et, en plus, une substance amorphe qui semblait venir du fluide gingival. Les polynucléaires neutrophiles furent aussi aperçus à l'intérieur de l'épithélium du manchon épithélial indiquant que ces cellules proviennent des tissus adjacents pour migrer dans le cul-de-sac gingival.

KRASSE et EGELBERG (56) se penchèrent sur le fait que le fluide gingival pouvait être :

- soit un transsudat sérique qui passerait à travers l'épithélium du manchon gingival,
- soit une exsudation d'un tissu en période inflammatoire.

Pour ceci, ils étudièrent le rapport Na/k. En effet, si le fluide est simplement un transsudat sérique, il devrait avoir la même proportion Na/k que le sérum sanguin. Au contraire, s'il collecte au passage des éléments de tissus pathologiques, le rapport Na/k sera abaissé à cause de l'accumulation de potassium intra-cellulaire au niveau des cellules éclatées.

Effectivement, ils trouvèrent un rapport Na/k très abaissé dans les poches enflammées, un peu moins abaissé au niveau des gencives saines. Ils en conclurent donc que le fluide gingival ne pouvait pas être considéré comme une simple filtration, mais plutôt comme un exsudat inflammatoire.

Actuellement, on inclinerait à penser que le fluide gingival serait plutôt un transudat sérique modifié qui collecterait, au niveau du manchon épithélial gingival, du matériel cellulaire riche en potassium à partir de cellules épithéliales en voie de desquamation.

COLLINS et GAVIN examinèrent, pour leur part, le pouvoir antimicrobien du fluide gingival à partir de sujets sains (32). Du fluide gingival fut collecté avec des strips. Les strips furent mis en incubation sur des préparations à l'agar agar préalablement ensemencées par différentes souches microbiennes. Les auteurs ne purent noter, en aucun cas, une inhibition de la prolifération microbienne au niveau des strips imbibés du fluide gingival. Par contre, ils purent observer des proliférations importantes microbiennes quand les papiers filtres étaient placés sur des préparations stériles.

BROWNE chercha à élucider le mécanisme de formation et le cheminement du fluide gingival (24). Il inocula des lapins avec NaI et NaCl radioactifs et avec le diodofluorescéine (IDF) et sérum albumine tous les deux marqués à l'iode radioactif. Il recueillit le fluide gingival avec des papiers filtres et il assembla les différents échantillons recueillis pour avoir une quantité suffisante. Il put voir que DIF et l'albumine se retrouvaient régulièrement au niveau du sillon gingival, mais Na et I furent détectés occasionnellement; ils conclurent donc que certaines substances passent plus facilement dans le fluide gingival que d'autres.

MANN, en 1963, (66), étudia les protéines du fluide gingival mais, à l'inverse de BRILL et BRONNESTAM, il trouva des concentrations identiques à celles du sérum, même en ce qui concerne les gamma globulines. Il utilisa l'électrophorèse sur papier et la micro-double diffusion avec des anti-sérums spécifiques. Il montra aussi la présence d'albumine, d'alpha I, d'alpha 2, bêta et gammaglobulines.

MANN montra aussi les relations qui existent entre écoulement gingival et maladies parodontales.

Statistiquement, il démontra que l'inflammation a une plus grande incidence sur le fluide gingival que la profondeur des culs-de-sac (67).

Pour résumer ces précédents études bibliographiques, nous pouvons dire que le fluide gingival est un transsudat sérique dont la composition protéique est quasiment identique à celle du sérum. On retrouve les mêmes protéines que dans le sérum avec des concentrations qui sont pratiquement identiques.

Le liquide collecte, au niveau du manchon épithélial, du matériel intra-cellulaire.

L'importance de l'écoulement du fluide gingival est fonction de l'inflammation gingivale clinique et non pas fonction de la profondeur des poches. La question de savoir si cet exsudat existe au niveau d'un parodonte parfaitement sain n'a pas été tranché par les précédents auteurs. Des expériences contradictoires de deux auteurs différents n'ont pas résolu la question. En effet, certains auteurs seraient enclins à considérer le fluide gingival uniquement comme un liquide inflammatoire.

§

§

§

RAPPEL ANATOMIQUE ET HISTOLOGIQUE DU SILLON GINGIVO-DENTAIRE

Le sillon gingivo-dentaire, CHAPUT (28), est limité par l'organe dentaire qui comprend : l'émail, le ciment et la dentine, et par une partie de la gencive : la gencive libre ou feston gingival. Cette gencive libre n'adhère pas au collet de la couronne; elle en est séparée par un espace virtuel : le sillon gingivo-dentaire qui a environ 0,8 mm. de profondeur dans les conditions normales. Voir schéma n° 1. Page 12.

La face axiale de la gencive libre constitue la périphérie du sillon gingivo-dentaire; elle est limitée du côté Radiculaire de la dent par l'attachement épithélial.

La face périphérique de la gencive libre est lisse et souvent limitée du côté vestibule par un sillon parallèle au bord du feston gingival qui correspond, au fond, au sillon gingivo-dentaire.

Le bord de la gencive libre est festonné, il suit le contour du collet anatomique de la couronne dentaire au niveau de la jonction amélo-cémentaire.

Après la gencive libre, nous distinguons la gencive adhérente qui fait suite à la précédente.

On distingue :

1) La face profonde de la gencive adhérente avec :
- une zone cervicale qui s'insère au collet de la dent et forme le manchon épithélial qui adhère à la cuticule de l'émail, au ciment ou à la dentine, de part et d'autre de la jonction amélo-cémentaire.

2) La face périphérique de la gencive adhérente.

Au point de vue histologique, la gencive est un tissu épithélio-conjonctif. Voir schéma 2. Page 12.

La zone superficielle de la gencive peut être non kératinisée, kératinisée ou para-kératosique; toutes les transitions entre ces différentes formes sont normales.

L'épithélium non kératinisé est constitué par des cellules plates qui ont un noyau pycnotique. L'épithélium kératinisé est constitué par des couches de cellules aplaties sans noyau surmontant la couche granuleuse. La para-kératose est une kératinisation incomplète, les cellules aplaties ayant perdu leurs limites, leurs noyaux sont pycnotiques.

La zone intermédiaire de l'épithélium gingival est sous-jacente à la précédente. Les cellules, au microscope optique, sont unies par des filaments d'union.

La couche basale, ou stratum germinatum, en profondeur adhère à la lamina propia. Elle est formée de cellules cuboïdes légèrement allongées, analogues à celles de l'épiderme. Elle tapisse les digitations vasculaires du tissu conjonctif qui la double.

Les papilles vasculaires sont longues et nombreuses au niveau de la périphérie de la gencive. Elles contiennent des vaisseaux, des nerfs et quelques faisceaux collagènes et élastiques.

Enfin, le Chorion sous-jacent aux papilles est épais. Il est constitué par du tissu conjonctif dense dont les fibres profondes se confondent avec les fibres propres du périoste.

Enfin, au niveau du manchon épithélial, les cellules sont disposées en plusieurs couches; elles sont aplaties et il n'existe pas de kératinisation et l'on ne distingue pas de digitation papillaire.

La vascularisation de la gencive est assurée par des branches émanant des vaisseaux alvéolaires, des vaisseaux desmontaux et des vaisseaux périostés.

ils sont accompagnés d'abord pas des lymphatiques qui drainent vers les ganglions sous-mentaux et sous-maxillaires et ensuite par des filets nerveux.

La photogrammétrie stéréoscopique a permis d'observer la coexistence de 2 types de structure vasculaire au niveau des vaisseaux sous-épithéliaux de la gencive humaine (FORSLUND). On distingue une formation à "structure bouclée" formant des onses vasculaires et une autre à structure anastomosée.

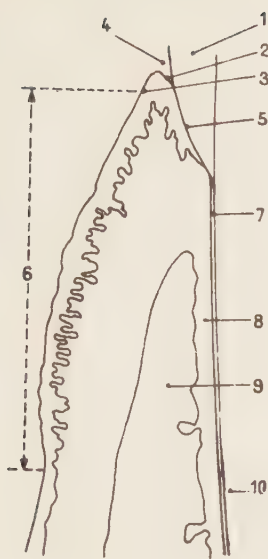


Schéma N° 1

(D'après Chaput)

- 1- Email
- 2- face axiale de la gencive libre
- 3- face périphérique de la gencive libre
- 4- sillon gingivo-dentaire
- 5- manchon épithélial ou attachement épithélial
- 6- gencive adhérente
- 7- cément
- 8- desmodonte
- 9- os alvéolaire
- 10- dentine

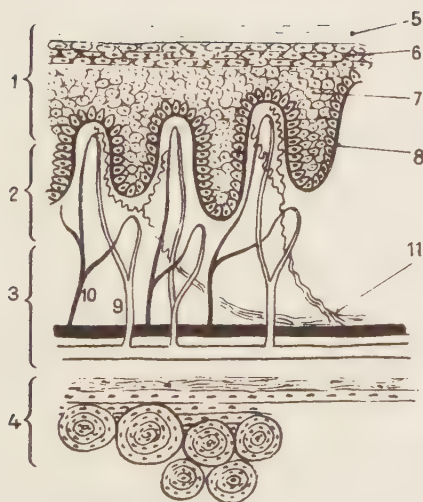


Schéma N° 2

(D'après Orban Held)

- 1- Epithélium superficiel
- 2- zone papillaire
- 3- chorion
- 4- périoste et tissu osseux
- 5- zone de desquamation de l'épithélium
- 6- couche granuleuse inconstants
- 7- couche épithéliale de Malpighi
- 8- couche basale
- 9- artère
- 10- veine
- 11- nerfs

ELEMENTS DE PHYSIOPATHOLOGIE PARODONTALE

Les maladies paradontales, en effet, se traduisent cliniquement par la création d'un cul-de-sac gingival, c'est-à-dire d'une véritable poche gingivale autour de l'organe dentaire.

Cette poche en quelque sorte détruit littéralement l'attachement épithélial et progresse en profondeur le long de la racine de la dent.

Il nous a semblé intéressant de noter ici quelques éléments physiopathologiques qui expliquent la formation du cul-de-sac parodontal.

En l'absence d'inflammation, la profondeur du sillon gingivo-dentaire reste constante, malgré une résorption du substratum osseux. Cette résorption physiologique normale se fait avec le vieillissement : en effet, parallèlement à l'atrophie alvéolaire physiologique, l'attachement épithélial-dentaire se déplace en direction apicale en entraînant la gencive libre. Au cours de ce déplacement, la gencive conserve son architecture normale.

Mais, dès que la profondeur du sillon gingivo-dentaire atteint 1,5 mm., nous rentrons dans le domaine de la pathologie : c'est la formation du cul-de-sac gingivo-dentaire.

L'apparition d'un tel cul-de-sac est fonction de deux processus différents :

- Hyperplasie de la gencive libre,
- Migration de l'attachement épithélial-dentaire en direction apicale et qui est la conséquence d'altérations tissulaires qui se développent au-delà de cet attachement.

Quoiqu'il en soit, nous dirons que la pathologie parodontale s'installe quand la résorption de l'os alvéolaire (qui est un processus physiologique du vieillissement) n'est pas suivie par une rétraction gingivale et même il se produit une invagination épithéliale et c'est ce qui amène la formation du cul-de-sac gingival, qui remplace ainsi l'ancien sillon gingivo-dentaire. Ce cul-de-sac peut avoir quelquefois plus de 1 cm. de profondeur^{et} à la phase terminale de la maladie, il peut atteindre l'apex de la dent jusqu'au moment où celle-ci s'expulse spontanément de son alvéole.

Il est classique d'observer, dans les maladies parodontales, la présence d'un liquide qui sort des poches parodontales ; aussi, l'étude de la physiologie de ce liquide "le fluide gingival" devrait-il nous permettre d'approfondir la connaissance que nous avons de ce fléau important que représentent les maladies du parodonte.

En effet, une récente enquête épidémiologique effectuée par l'O.M.S. a pu montrer que 80 % des dents extraites dans la région de BOMBAY, après l'âge de 30 ans, sont justifiées par la présence de lésions parodontales. Si l'on considère que la moitié au moins de la population de tout le globe vit dans des conditions identiques aux Indiens de BOMBAY, on peut apprécier, à sa juste valeur, l'étendue et la gravité des dégâts causés par les parodontopathies.

COMPOSITION DU FLUIDE GINGIVAL

Sur la base des récents travaux sur la question, on peut dire que le fluide gingival contient :

1/ Des acides aminés (19-66-108),
2/ Des protéines plasmatiques, comme l'ont démontré les travaux de BRILL et BRONNSTAM (20) et de MANN et STOFFER (66-68-99); en effet, ces travaux, grâce à ces procédés électrophorétiques, ont mis en évidence des :

- . albumines,
- . alpha I globulines,
- . alpha II globulines,
- . bêta globulines,
- . gamma M globulines,
- . gamma G globulines
- . et fibrinogènes (5-99)

3/ Des enzymes; nous citerons :

- . Bêta glucuronidase,
 - . Phosphatase alcaline,
 - . Phosphatase acide
 - . Lysozyme,
 - . Cathepsin D, etc...
- (92-93-9-53-54-82-97)

4/ Des facteurs fibrinolytiques,

5/ Du matériel cellulaire (36)

6/ De nombreux électrolytes, comme Na, K, Ca, P, etc... (104)

LES DIFFERENTES THEORIES DE L'EXPLICATION DU MECANISME DE LA PRODUCTION DU FLUIDE GINGIVAL

Nous allons passer en revue brièvement les différentes théories qui expliquent la production du fluide gingival.

1 - Une sécrétion glandulaire (7-86)

L'assertion selon laquelle le fluide gingival pourrait être une sécrétion glandulaire ne tient plus du tout, à l'heure actuelle; en effet, dans des conditions normales, aucune formation glandulaire n'apparaît au niveau de la gencive.

2 - Un transsudat sérique

Si le fluide gingival était un transsudat sérique, sa composition ionique devrait être identique à celle du sérum. Les travaux de KRASSE et EGELBERG (56) ont montré, effectivement, que le rapport Na/K était différent dans le sérum et dans le fluide gingival. Ainsi, le fluide gingival n'est pas purement et simplement un exsudat du sérum sanguin, mais des modifications importantes doivent se produire pour arriver à sa composition définitive.

3 - Un exsudat inflammatoire (56)

Toujours en étudiant le rapport Na/K du fluide gingival, on s'est aperçu que ce rapport était d'autant plus bas que l'état inflammatoire était fort. Etant donné qu'on constate une augmentation de la concentration du potassium dans les liquides extracellulaires des tissus lésés, ces observations laissent à supposer que le liquide du cul-de-sac gingival, même en provenance de gencives cliniquement saines, provient de tissus ayant un métabolisme altéré. Selon cette conception, cela indiquerait donc que le fluide gingival ne peut être considéré comme le produit d'une simple infiltration, mais plutôt comme un exsudat inflammatoire.

4 - Un transsudat sérique modifié (17-24)

Telle serait, actuellement, la théorie acceptée pour expliquer le mécanisme de production du fluide gingival, c'est-à-dire que ce serait un transsudat sérique modifié qui collecterait au niveau du manchon épithélial gingival du matériel cellulaire riche en potassium à partir de cellules épithéliales en voie de desquamation.

En effet, les cellules épithéliales qui bordent le manchon épithélial gingival ne sont pas kératinisées et peuvent très bien, lorsqu'elles desquament, altérer le transsudat sérique. Les cellules elles-mêmes du manchon épithélial peuvent activement jouer un rôle dans le transport des électrolytes. Des phénomènes analogues ont pu être observés au niveau des cellules épithéliales des glandes parodides et des néphrons.

ASPECTS PHYSIOLOGIQUES DU FLUIDE GINGIVAL

Nous dirons que le fluide gingival présente, sur le plan physiologique, des rôles positifs et des rôles négatifs.

A - Rôles positifs du fluide gingival

1 - Rôle nettoyant.

De par la force de son écoulement, le fluide gingival semble capable de nettoyer et de chasser différentes particules qui auraient pu se loger à l'intérieur du cul-de-sac gingival. En effet, les expérimentateurs ont pu insérer à l'intérieur des culs-de-sac gingivaux différents débris qu'ils ont vu s'éliminer au bout de quelque temps (19-49-105- travaux de WAERHAUG qui insérait des particules d'encre de chine). Il semble que ce soit ici un des rôles les plus importants du fluide gingival.

2 - Rôle antimicrobien.

Plusieurs études ont mentionné la présence de facteurs antimicrobiens dans le fluide gingival. Ainsi, la présence de nombreux leucocytes polymorphes découverts pourraient permettre la phagocytose (60).

Il semble que les gammaglobulines pourraient induire des phénomènes de défense et diriger des processus anticorps-antigènes (11-12-14-15-20-32-42-47-). Il doit être mentionné toutefois que toutes les gammaglobulines ne possèdent pas au même degré un pouvoir immunologique identique.

Quoiqu'il en soit, des expériences en cours, notamment aux U.S.A., tentent de mettre en évidence les processus immunopathologiques capables de jouer un rôle dans les maladies parodontales. Nous verrons d'ailleurs, à la fin de cette étude, les conclusions auxquelles nous avons abouti concernant cette importante question.

A l'heure actuelle, on peut seulement inclure les maladies parodontales dans le cadre des maladies où les troubles immunologiques généraux sont évidents comme :

- les hypogammaglobulinémies, ou
- les dysgammaglobulinémies,

de même que dans les cas où il existe une baisse de l'immunité cellulaire comme dans :

- les lymphopénies, ou
- les dyslymphocytoses.

La présence d'autres facteurs antimicrobiens, comme le lysozyme et la protéase, a pu être mise en évidence; ceci laisse le champ libre à de nombreuses investigations.

3 - Rôle_fibrinolytique.

Les travaux de GUSTAFSON (46) ont pu mettre en évidence un rôle évident de fibrinolyse gingival; ceci peut être intéressant car cela permet d'éviter l'obstruction de l'écoulement du fluide gingival lorsqu'il peut se déposer des dépôts de fibrine ou autres protéines au niveau du sillon gingival. De tels systèmes de défense existent au niveau des canaux excréteurs de certaines glandes et évitent ainsi l'oblitération des canaux excréteurs, lors de faibles traumatismes. On peut donc facilement imaginer que des troubles de ce rôle fibrinolytique. peuvent faire apparaître des troubles parodontaux.

4 - Rôle_sur_l'attachement_épithélial.

SCHULTZ HAUDT et ses collaborateurs (83) ont pu montrer

que le fluide gingival, de par sa composition en ions, en protéines sériques et en fibrines, pouvait augmenter l'attachement épithélial de la gencive grâce à des liaisons de nature chimique qui se feraient au niveau de cet espace. Cette liaison augmenterait ainsi celle qui se produit grâce à des forces électrostatiques.

B - Aspects négatifs du fluide gingival

1 - Développement des bactéries (8-15-16-32-44-83-84-86-105)

On a pu dire aussi que le fluide gingival, de par sa composition en ions et en protéines, constituait un milieu idéal pour la prolifération bactérienne.

2 - Formation des calculs gingivaux (56-104)

Le rapport étroit entre la formation des calculs sous-gingivaux et le fluide gingival devra être établi formellement. Quoiqu'il en soit, on a pu trouver, dans le liquide gingival, des quantités importantes de calcium et, à l'heure actuelle, on peut penser que le fluide gingival participe à la formation des calculs tartriques sous-gingivaux.

Les différences de composition du fluide gingival qui existent d'un sillon gingival à l'autre et d'un individu à un autre, permettraient d'expliquer les variations qui existent entre les différents calculs sous-gingivaux.

MOYENS D'ETUDE

Notre étude a porté essentiellement sur les protéines du fluide gingival. Etant donné les faibles quantités de matériel d'expérimentation dont nous disposions, nous nous sommes d'emblée orientés vers une étude immunoélectrophorétique. Cette étude a été réalisée dans le laboratoire des protéines du Docteur MANUEL à l'Institut Pasteur de LYON.

I - RECUEIL DU LIQUIDE GINGIVAL (68-20-76)

De nombreux auteurs avaient surtout prélevé le fluide gingival au moyen de minces papiers filtres et nous avons d'ailleurs utilisé cette méthode quand il s'agissait de prélever du fluide gingival quand il existait en quantités peu importantes, c'est-à-dire dans les cas de parodontes non pathologiques.

Pour cela, nous introduisons dans le sillon gingival une bande de papier filtre pas trop épais, d'une longueur de 2 à 5 cm. environ et d'une largeur de 2 à 5 mm.

L'insertion du papier filtre se fait avec un instrument plat, comme une spatule par exemple, et nous prenons la précaution de ne pas blesser la gencive pour éviter l'apparition d'une petite hémorragie.

Des rouleaux de coton sont placés au niveau de la région qui nous intéresse pour éviter la contamination des papiers filtres par la salive buccale.

Il faut attendre plusieurs minutes (5 à 10 mn.) pour recueillir de cette manière une petite quantité de fluide gingival au niveau de l'extrémité du papier filtre.

Sur les travaux de référence concernant le fluide gingival sain, nous avons recueilli une série de prélèvements

que nous avons rassemblés pour avoir une quantité plus importante de fluide gingival et obtenir ce que les américains appellent un "pool".

Les papiers filtres collectés sont conservés dans le "freezer" d'un appareil frigorifique ordinaire jusqu'à ce qu'on obtienne une quantité suffisante de papiers filtres, c'est-à-dire environ une cinquantaine environ. Puis ensuite, les papiers filtres sont repris par du sérum physiologique 24 heures à + 4°C, puis centrifugés. Le surnageant est recueilli et étudié soit directement, soit après concentration.

Mais il nous est apparu, pour la commodité de nos expérimentations, que ce moyen était peu pratique, surtout quand la quantité de fluide gingival que l'on pouvait recueillir était plus importante, c'est-à-dire dans le cas de gencives pathologiques.

De récents auteurs avaient utilisé des tubes capillaires pour absorber le fluide gingival comme BRANTZEEG et MANN (9). De même, en SUISSE, SUEDA et CIMASONI (94) se sont servis de ces ~~tubes~~, très fins en verre.

Il nous est apparu que ce procédé représentait une manipulation difficile mais surtout qu'il blessait la gencive et qu'il faisait apparaître du sang, d'où source d'erreur pour nos résultats. Aussi nous avons mis au point un procédé personnel. La région où doit être pratiquée la prélèvement est soigneusement séchée et on attend quelques minutes que l'écoulement du fluide gingival apparaisse.

On place alors un catheter au contact du fluide gingival. Ce catheter est en polyéthylène à usage chirurgical, chimiquement neutre, de diamètre interne de 0,58 mm. et de diamètre externe de 0,96 mm., longueur 7 à 8 cm.

Le catheter est lui-même branché sur un trocart légèrement plus large qui est lui-même fixé à une seringue.

Nous tirons très délicatement le piston de la seringue et le fluide gingival, par aspiration, vient remplir le catheter en polyéthylène. Il faut manipuler le piston suffisamment délicatement pour éviter que le fluide gingival aboutisse dans la seringue.

Le prélèvement est conservé à la température d'un réfrigérateur : + 4°C et mis dans une atmosphère à degré hygrométrique important pour éviter la dessiccation avant d'être livré le plus rapidement possible au laboratoire pour analyse.

II - METHODE D'ETUDE DES PROTEINES

Comme nous l'avons déjà dit, nous nous sommes efforcés d'étudier les protéines du fluide gingival : étant donné les faibles quantités du liquide recueilli, nous nous sommes tournés tout de suite vers une étude électrophorétique et plus précisément immunoélectrophorétique pour les fractions du fluide gingival recueilli individuellement dans les cas pathologiques et vers l'immuno-diffusion radiaire pour les dosages de protéines dans les cas de fluide gingival normal.

Il nous a semblé intéressant de rappeler les notions élémentaires concernant les techniques immunoélectrophorétiques et les techniques de dosage immunochimiques. Ces techniques, en effet,^{ne} nécessitent qu'un volume très faible d'échantillons. Les quantités de fluide gingival recueilli n'ont pas permis d'utiliser les autres techniques électrophorétiques.

- L'Immunoélectrophorèse

L'Immunoélectrophorèse est une technique d'analyse des protéines qui fait appel consécutivement à deux méthodes : l'une physique, l'autre immunologique. Le mélange des protéines est d'abord séparé par électrophorèse sur un support inerte, généralement constitué par de la gélose; dans ce milieu se déroulera la deuxième étape immunologique.

Un antisérum est placé dans une gouttière située à angle droit du trajet de séparation.

Il se produira une double diffusion, d'une part les protéines, préalablement séparées, qui constituent l'antigène, d'autre part de l'anticorps représenté par l'immunosérum ; au point de rencontre se formeront des arcs de précipitation spécifique. Cette technique se fait en deux temps, elle est due à GRABAR et WILLIAMS :

- 1) Une migration électrophorétique en gel de gélose ou d'agarose.
- 2) Une révélation immunologique.

1er temps - Electrophorèse en Agar Agar selon la méthode de WIEMA

Cette méthode est préconisée par LATERRE, notamment pour l'étude des protéines des liquides céphalo-rachidiens. Elle est caractérisée par une migration en Agar Agar sous éther de pétrole refroidi. La plaque de gélose retournée dans l'éther de pétrole est en contact direct avec de la gélose qui sert d'électrode. Cette technique est très rapide et ne nécessite que des quantités très petites de produit. Elle donne une excellente résolution et permet, dans une certaine mesure, d'éviter l'électrophorèse sur papier et l'électrophorèse en gel d'amidon.

2ème temps - Une révélation immunologique des fractions ainsi séparées

Les résultats de l'électrophorèse en gélose sont superposables à ceux de l'électrophorèse sur papier : cette technique va permettre de séparer cinq fractions protéiques dans le sérum. :

- . albumine
- . alpha I globuline
- . alpha II globuline
- . bêta globuline
- . gamma globuline.

On dispose ainsi, dans des rigoles découpées parallèlement à l'axe de migration, un sérum généralement de cheval ou de lapin préalablement immunisés contre du sérum humain.

Ce sérum contient donc des anticorps antiprotéines humaines. Chaque anticorps est spécifique d'une de ces protéines qui se conduit elle-même comme un antigène. Il est possible par cette technique de différencier de nombreuses autres catégories protéiques dans les fractions protéiques qui ont été préalablement dissociées par l'électrophorèse en gélose. Il faut savoir que si la diffusion de l'immunsérum est une diffusion linéaire parallèle à cette rigole, la diffusion des protéines, elle, est une diffusion concentrique à la tâche de migrations de ces protéines, puisque, dans la technique que nous utilisons, l'inclusion est punctiforme et ceci explique que la ligne de précipitations soit une ligne courbe.

Cette notion appelle une remarque importante : la rapidité de diffusion dans le milieu gelose de l'immunsérum est toujours la même pour une série d'immunoélectrophorèses considérés, puisque l'immunsérum utilisé est le même. Par contre, la rapidité de la diffusion dans la gelose de chaque fraction protéique va être étroitement dépendante de sa forme et de sa masse moléculaire, si bien qu'une protéine de faible encombrement ou de faible masse moléculaire diffusera beaucoup plus vite qu'une macro-molécule par exemple. Ainsi donc, la place même par rapport à l'axe de migration de la courbe de précipitation antigène-anticorps pourra donner une idée sur la dimension de la molécule protéique qui l'a produite.

Un autre point intéressant est la difficulté d'obtenir une ligne de précipitation dont l'intensité soit proportionnelle à la quantité de protéines qui l'a produite. Expliquons-nous : il existe un rapport optimum antigène-anticorps, rapport qui va conditionner l'intensité de la ligne de précipitation observée. En ce qui concerne l'immunsérum de cheval, ce rapport se situe dans des limites relativement étroite,

tout excès d'antigène par rapport à l'anticorps ou inversement tout excès d'anticorps par rapport à l'antigène provoquera une redissolution partielle ou complète de cette ligne de précipitation. Si bien qu'il faut savoir qu'une absence ou une faible ligne de précipitation ne veut pas forcément dire absence ou faible quantité de la protéine correspondant mais peut vouloir dire aussi excès de cette protéine par rapport à l'anticorps apporté par l'immunsérum ou, inversement, excès par rapport à la protéine considérée. Ce phénomène correspond à une courbe d'équivalence étroite en opposition à la courbe d'équivalence large qui caractérise d'autres animaux; c'est ainsi que chez le lapin ou la chèvre les anticorps produits donnent des réactions de précipitations antigène-anticorps qui sont beaucoup moins sensibles aux rapports antigène-anticorps (équivalence large).

Il existe de nombreuses techniques d'immunoélectrophorèse et nous ne voulons pas décrire ^{toutes} celles qui existent; nous nous contenterons de décrire celle qui est en usage dans le laboratoire du Docteur MANUEL, qui est une technique dérivée de la technique de SCHEIDEGGER, d'ailleurs considérablement modifiée (80).

a) Préparation des plaques de gélose

La gélose que nous utilisons est une gélose très pure que nous préparons en solution stock à 6 %. La gélose est dissoute à l'étuve à 90° C pendant 48 heures dans de l'eau distillée. Elle est ensuite étalée en couches de 1 à 2 cm.; après refroidissement, elle est découpée en petits cubes et mise à dialyser pendant 8 jours. Dans de l'eau distillée additionnée d'Azothydrate de Na à 1 pour mille pour éviter toutes contaminations bactériennes. Les cubes deviennent ensuite parfaitement blancs et sont propres à leur utilisation. Pour l'électrophorèse elle est ensuite amenée à une concentration de 1,5 pour mille. Le tampon utilisé pour des migrations est celui de HIRSCHFELD dont la composition est la suivante :

- pour 10 litres de tampon :

- . Véronal sodé : 105,10 g.
- . Véronal acide : 16,60 g.
- . Lactate de calcium (5 H₂O) 15,36 g.

Après plusieurs essais, il a été préféré ce tampon au tampon Véronal-Véronal sodique de DURRUM (force ionique 0,05) qui sépare mal les fractions bêta 2 et au tampon MICHAELIS Véronal-Acétate HCN, qui est trop sensible au vieillissement.

Le tampon au lactate de calcium, par contre, sépare parfaitement la zone alpha I et alpha II, ainsi que la zone bêta 2. Il est d'une souplesse importante et ne nécessite pas un renouvellement fréquent.

Nous avons utilisé la technique décrite par WIEME sur l'appareillage VITATRON. Cette technique est la même que celle décrite plus haut pour l'électrophorèse en Agar Agar. Elle a été légèrement modifiée en utilisant des plaques de migration de 12,5 cm x 8 cm. Ces plaques permettent de faire une migration simultanée de 10 à 11 liquides. Les gouttières d'inclusion^{des} immuns-sérum ont 15/10e de mm. de large. L'inclusion est faite dans un trou pratiqué dans la gélose avec une aiguille de 10/10e de diamètre. La distance entre deux gouttières est de 8 mm. ; la longueur de migration est de 55 mm. La durée de migration est de l'ordre de 45 minutes pour une différence de potentiel de 140 volts pour un tampon Véronal acide, Véronal basique de pH. 8,6. Cette méthode permet d'étudier, comparative-ment à leur sérum correspondant, les différents échantillons.

b) Migration et révélation

Une fois la migration effectuée, nous enlevons la petite bande de gélose dans les rigoles qui ont été préalablement découpées. Nous y mettons l'immunsérum et laissons diffuser 48 heures. La plaque est ensuite lavée au sérum physiologique pendant 48 heures, puis lavée une deuxième fois à l'eau

distillée pour éliminer les sels pendant quelques heures, et ensuite séchée sous une lampe à infrarouge pendant 2 heures.

La plaque est mise dans un bain colorant qui a été fait à partir d'un mélange d'acide acétique à 5 % et d'une solution stock composée d'azocarmin à 1 % dans un tampon acide acétique acétate. La coloration dure un quart d'heure, la décoloration est très rapide. Elle se fait dans un bain d'acide acétique à 5 % pendant 15 mn.; la plaque est séchée et prête à être photographiée.

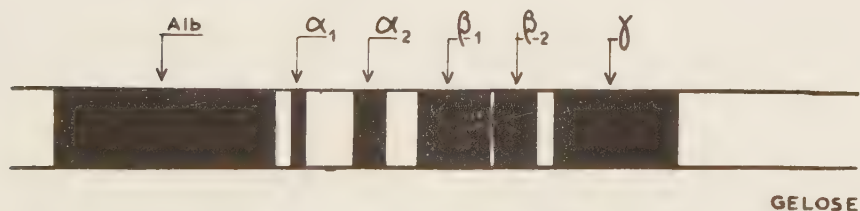
Principes d'interprétation des traces immuno-électrophorétiques.

La nomenclature utilisée est celle de GRABAR. Le tableau présenté indique la nomenclature adoptée et les corrélations actuellement connues entre les différentes techniques d'électrophorèse et quelques autres moyens d'étude des protéines du sérum.

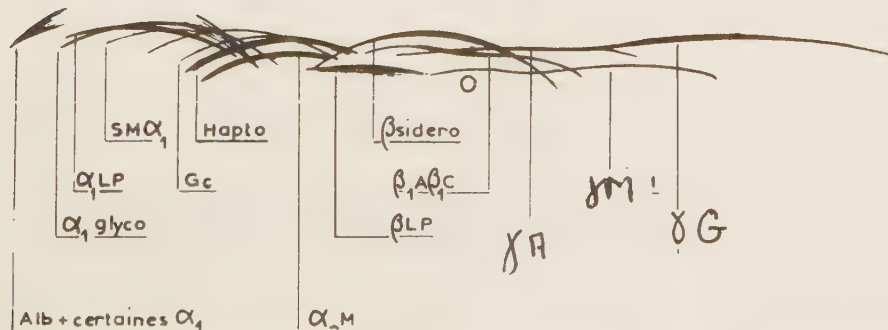
Les schémas ensuite présentés indiquent les différentes fractions de protéines qui sont révélées d'abord dans la gélose et ensuite par les procédés immunoélectrophorétiques.

Nomenclature adoptée	Abréviations	Principaux synonymes employés dans les travaux consultés
Préalbumine rapide	Pré Alb. rapide	Préalbumine riche en tryptophane, préalbumine ρ , ρ protéine riche en tryptophane.
Séromucoïde α_1	SM α_1	Orosomucoïde, séromucoïde acide, α_1 - glycoprotéine acide, séromucoïde α_1 , fraction perchlorosoluble acide de SCHMID.
α_1 3,5 glycoprotéine	α_1 3,5 glycoP.	α_1 glycoprotéine 3,5 de SCHULTZE α_1 principale, trypsin inhibitor glycoprotein, anti-trypsin glycoprotéine, α_1 A ?
α_1 lipoprotéine	α_1 lp	
Gc globulines	Gc	Group specific component (Gc 1-1, Gc 2-1, Gc 2-2) de HIRSCHFELD.
Haptoglobine monomère	Hp 1-1	Haptoglobine type I de Jayle, séromucoïde α_2 léger.
Haptoglobine polymère	Hp - p	Haptoglobine type II de Jayle, H _D 2-1 et H _D 2-2.
α_2 macroglobuline	α_2 M	Séromucoïde α_2 lourd, α_2 glycoprotéine (SOOTHILL).
α_2 légères de SCHMID	Ba α_2 Zn α_2	α_2 Ba glycoprotéines, α_2 Zn glycoprotéine.
Céruleoplasmine		α_2 globulin IV (HIRSCHFELD).
Sidérophiline	β sid.	β - siderophile, β - transferrine.
Hémopexine	β_1 B	Cytochromophile β_1 X (BISERTE), hemoglobin binding β_1 globulin (HIRSCHFELD).
β_1 A	β_1 A	Séromucoïde β_1 de BISERTE, ((complément)) (représente une forme du C'3 dans le sérum vieilli, apparaît en β_1 C sur le sérum frais).
γ A globuline	γ A	γ_1 γ_1 A, Ig A, β_2 A
γ M globuline	γ M	β_2 macroglobuline, γ_1 M, Ig M, γ 19s.
γ G	γ G	γ normales, γ_2 , γ_7 s, Ig G.

NOMENCLATURE ADOPTÉE



GELOSE



ASPECT DU SÉRUM HUMAIN NORMAL EN GELOSE ET IMMUNO-ELECTROPHORESE

Noms	Poids mol.		Point isoélectrique	Taux dans le sérum normal
Pré-albumine	61 000	4,1 à 4,2		0,1 à 0,5 %
Albumine	67 000	4,6	4,7	55 à 60 %
SM α	43 000	3,11	1,8 à 2,7	0,75 g°/∞
α_1 3-5 glycoprotéine	54 000	3,41		0,30 g°/∞
α_1 lipoprotéine	75 à 435 000	4,11 à 5,5		3,8 %
α_2 légères de SCHMID	40 000 41 000	2,6 3,2		
Gc globulines	40 à 50 000			
Céruleoplasmine	151 000	7,1	4,4	0,30 g°/∞
α_2 macroglobuline	820 à 950 000	19,6	5,4	2,4 g°/∞
Haptoglobuline Hp 1-1	85 000	4	4,1	} 0,9 à 1,4 g°/∞
Haptoglobine Hp poly.	170 000	6,7		
β α_2 lipoprotéine	1 300 à 3 450 000	2,9 à 12		4 à 14 %
Sidérophiline	88 000	5,0 à 6,1	5,9	2,5 à 3,5 g°/∞
Hémopexine				
Complément C'3				
γ A	160 000	7		1/2 g°/∞
γ M	1 000 000	19 à 20		0,75 g°/∞
γ G	160 à 170 000	6,9 à 7	7,3	12 à 15 g°/∞

CERTAINES CONSTANTES DES PROTEINES ETUDIEES

- Etude de certaines protéines par immuno-diffusion radiaire.

La technique employée dérive de la technique décrite par MANCINI (64). Nous avons utilisé une modification faite par Vicente LOPEZ et Simon GOLDER (63).

Le principe de la technique est le suivant : lorsqu'on met en contact un antigène en solution avec un anticorps en solution, il se produit un précipité Ag-Ac. Théoriquement, la quantité de précipité obtenue est proportionnelle à la quantité d'Ag introduite. Une modification de cette technique a été apportée par OUDIN qui pratique une technique légèrement modifiée où l'Ac n'est plus en solution en milieu liquide mais se trouve incorporé à un gel de gélose contenant l'Ac. L'Ag diffuse dans le gel de gélose et provoque la formation d'un complexe Ag-Ac parfaitement visible dans la gélose. A ce moment, se produit un phénomène comme dans toute réaction de ce type. En effet, la formation d'un complexe Ag-Ac dépend en fait des concentrations relatives existant entre l'Ag et l'Ac. S'il y a excès trop important de l'un par rapport à l'autre le complexe Ac se redissout et disparaît. Dans le cas de diffusion en tube, lorsque la ligne de précipitation Ag-Ac se produit dans la gélose, il y a un rapport optimum entre la concentration à ce niveau de l'Ag et de l'Ac inclus dans la gélose. Lorsque ce complexe s'est formé, la diffusion amène une quantité nouvelle d'Ag qui redissout ce complexe Ag-Ac; la diffusion se continuant, le complexe Ag Ac se reforme un peu plus loin et ainsi de suite... Si bien que, dans ces conditions, la vitesse de progression, à l'intérieur du milieu gélifié du complexe Ag-Ac se formant, se redissolvant et se reformant juste après, est proportionnelle à la concentration de l'Ag dans la solution qui a été mise au contact de la gélose dans le tube. Lorsqu'il n'y a plus d'Ag dans la solution, c'est-à-dire lorsque l'Ag a complètement diffusé dans la gélose, le complexe Ag-Ac ne bouge plus et la distance de migration, cette fois-ci, est proportionnelle, non plus à la concentration de l'Ag, mais à la quantité d'Ag qui était présente dans la solution.

MANCINI a modifié cette technique en incorporant une certaine quantité d'Ac dans la gélose elle-même qu'il coule sur une plaque. Il a creusé cette plaque de gélose de petits puits dans lesquels il inclut une solution contenant l'Ag. Cet Ag va diffuser excentriquement à partir de ces petits puits d'inclusion et former des lignes de précipité Ag-Ac qui vont progresser de la même façon décrite plus haut, mais cette fois-ci sous forme de cercle. La vitesse d'agrandissement du cercle, c'est-à-dire la vitesse d'augmentation du diamètre de ce cercle, va donc être proportionnelle à la concentration de l'Ag qui est présente dans la solution. Lorsque la solution est épuisée en Ag, c'est-à-dire lorsque l'Ag sera complètement diffusé dans la gélose, le diamètre de ce cercle se stabilisera et sera proportionnel à la quantité d'Ag introduite dans le puits au préalable fait dans la gélose.

Cette méthode s'est avérée être une méthode très reproductible, très précise, et d'un emploi relativement aisé. Vincente LOPEZ et Simon GOLDER ont proposé une modification que nous avons utilisée car elle donne une plus grande souplesse à l'utilisation de cette méthode. On utilise des plaques en plexi-glas comprenant 18 trous cylindriques de 1-2 mm. de profondeur et 12 mm. de diamètre. Le remplissage des trous se fait avec 220 ml. de gélose à 1,5 % en tampon Véronal chauffé au bain-marie en utilisant soit une pipette graduée, soit une micropipette avec verueur étalonné automatique.

On laisse solidifier à la température du laboratoire. L'originalité de cette méthode est que l'on met l'anti-sérum à une dilution convenable sur la surface de chaque disque de gélose. Après 72 heures de contact l'Ag diffuse à travers la gélose et ceci d'une façon parfaitement homogène; cela évite d'incorporer l'anticorps au préalable dans la gélose et notamment de l'incorporer dans une gélose à 60°; on évite ainsi les phénomènes de dénaturation de l'Ac, dénaturations qui, malheureusement, ne sont pas toujours homogènes. Le gros inconvénient de la méthode de MANCINI est que l'on peut avoir des dénaturations d'Ac qui ne sont pas homogènes sur toute la plaque considérée.

La méthode de Vincente LOPEZ et Simon GOLDER permet donc d'incorporer l'Ac dans une gélose refroidie. D'autre part, les disques de gélose ainsi étudiés permettent de faire varier les conditions de rapport Ag-Ac à l'infini puisque on peut, sur une même plaque, comparer des concentrations différentes d'Ac incorporées à la gélose, ce qui n'est pas possible avec une plaque dans la technique de MANCINI.

A partir de cette technique, on peut augmenter considérablement la possibilité de la méthode. Prenons, par exemple, des gamma G globulines. Normalement, les Gamma G globulines se trouvent à une concentration de 1200 mg.% dans un sérum normal. Pour que cette quantité puisse être appréciée par la technique d'immunodiffusion que nous avons décrite, nous devons mettre, pour une pastille de gélose, 40 microlitres d'un immun-sérum. Immun-sérum qui est fourni par : le Centre de Transfusion Sanguine de BOIS-GUILLAUME, près de ROUEN - Directeur : M. ROPARTZ.

L'immunsérum utilisé doit être spécifique des chaînes lourdes d'immuno globulines G. Il ne révèle donc pas les chaînes légères d'immuno-globulines G, donc il ne révélera aucun motif appartenant soit à des chaînes légères libres, soit à des chaînes légères liées à d'autres immuno-globulines : gamma A ou gamma M par exemple. Il permet donc de doser les seules immuno-globulines G. Cet immun-sérum à une concentration de 40 μ l. pour 220 mg. de gélose permet de faire un dosage dans la zone de 1200 mg. % jusqu'à 300 mg. %, sa sensibilité ne descend pas en-dessous. Si, par contre, on diminue considérablement la quantité d'immun-sérum, c'est-à-dire d'anticorps anti-gamma globulines dans les disques de gélose, la sensibilité va augmenter considérablement. Si, au lieu de mettre 40 μ l. d'immun-sérum, on met seulement 5 μ l. d'immun-sérum, au préalable dilué dans 20 μ l. de sérum physiologique, on obtient une sensibilité qui permet d'apprécier des concentrations en γ G. jusqu'à 1 mg. %. Cette sensibilité permet de doser directement les gamma G globulines dans les liquides pauvres en protéines, comme le liquide céphalo-rachidien.

Cette méthode nous l'avons donc utilisée pour étudier la composition du fluide gingival en gamma G globulines.

La même méthode est applicable pour n'importe quelle protéine à condition d'avoir l'immun-sérum spécifique correspondant, donc les Ac correspondants. Nous avons donc utilisé la même technique pour doser :

- la ~~s~~édérophiline
- l'albumine
- les I.G.A. (immuno gamma globuline A)
- les I.G.M. (immuno gamma globulines M).

Malheureusement, nous n'avons pas pu nous procurer à temps des immuns-sérums spécifiques, des pièces de transport des immuno-globulines A. Mais nous nous proposons, dans un temps ultérieur, de compléter cette étude.

Les immuns sérums utilisés pour les immuno globulines, eux, viennent du Centre Départemental de Transfusion Sanguine de BOIS-GUILLAUME (Dr ROPARTZ).

Les autres immuns sérums spécifiques ont été fournis par la firme BEHRINGWERKE et par le Centre National de Transfusion Sanguine d'AMSTERDAM.

R E S U L T A T S

RESULTATS CONCERNANT LE FLUIDE GINGIVAL DANS LE CAS DE GENCIVES CLINIQUEMENT SAINES

1- Mode de prélèvement :

Comme nous l'avons déjà décrit précédemment, des papiers filtres sont placés au niveau du sillon gingival et sont retirés au bout de quelques minutes quand le fluide gingival a imbibé les papiers filtres. Une cinquantaine de prélèvements ont été faits pour réaliser un "pool".

Les papiers filtres sont conservés dans un freezer d'un appareil frigorifique.

2 - Les papiers filtres sont repris dans 3 ml. de sérum physiologique, puis centrifugés.

3 - Deux séries de prélèvements ont été faites.

Première série :

- . Albumine 67 mg. pour 100
- . Gamma G 14 mg. pour 100
- . Gamma A indécélable (inférieur à 1 mg. pour 100)

Deuxième série :

- . Albumine 16 mg. pour 100
- . Gamma G 4,4 mg. pour 100
- . Gamma A indécélable (inférieur à 0,5 mg. pour 100)

La concentration protéique, du fait de la dilution, est incalculable.

Le rapport $\frac{\text{Albumine}}{\text{Gamma G}}$ est égal :

. 1ère série = 4,8

. 2ème série = 3,6

Ces rapports sont identiques à ceux trouvés dans le sérum (3,5 à 4,5). Ils sont différents de ceux du liquide céphalo rachidien 6 à 12.

RESULTATS DES PRELEVEMENTS DANS LES CAS PATHOLOGIQUES

Etant donné la très faible quantité de liquide que nous avons pu recueillir, nous avons utilisé, comme seule méthode, l'immunoélectrophorèse qui donne le maximum de renseignements et utilise le minimum de produit.

Nous n'avons, malheureusement, pas pu faire un taux protéique; nous avons donc été obligés de l'estimer par rapport à d'autres produits de référence. Nous avons retenu uniquement les liquides qui ne présentaient pas d'Hémoglobine.

Par ailleurs, il faut signaler que la présence ou l'absence de telle ou telle ligne correspondant à telle ou telle protéine doit être discutée en fonction du taux protéique; en effet, telle ou telle ligne peut ne pas apparaître à l'immunoélectrophorèse, car la quantité de protéine présente dans le liquide n'est pas suffisante pour que cette protéine s'y trouve en quantité telle qu'elle puisse donner un arc de précipitation Antigène-Anticorps visible.

GUT ... Jeanne
Femme 45 ans,

(Voir tracé n° 1) - PLANCHE A

parodontolyse au début, cul-de-sac peu profond.
Surtout gingivite chez une femme à la période
de la ménopause.

Prise fluide gingival

1	2
3	3

 en quantité peu
importante.

Prisé de sang dans le veine. On peut noter la
présence de :

- albumine
- transferrine
- gamma G globuline
- gamma A globuline

Comparée au sérum, la quantité relative d'albumine
de gamma G globuline, de gamma A globuline et de transferrine
est identique. On peut donc supposer que les autres protéines
seraient présentes si on avait eu assez de liquide pour le
concentrer.

Taux protéique : 10 g./ l.

DEW... Martine

(Voir tracé n° 2) - PLANCHE A

jeune fille : 16 ans.

Gingivite hypertrophique avec décollement des
languettes gingivales.

Prélèvement du fluide gingival au niveau des
incisives inférieures. On voit :

- pré albumine
- albumine
- alpha I antitrypsine
- alpha 2 macro globuline
- hapto globine
- sidérophiline
- gamma A globuline
- gamma G globuline

Taux protéique : 30 g./ l.

On a donc une composition très proche du sérum.

OT...

(Voir tracé n° 3) - PLANCHE A

Homme 37 ans

Parodontite aiguë à la phase terminale.

Poches profondes

Lésions infra osseuses.

Prélèvement de fluide au niveau de 1 | 1

Prises de sang.

Résultats immuno-électrophorétiques.

Le taux protéique est ici élevé de l'ordre de 40 g./ l. comparable à celui du sérum.

On retrouve dans le fluide gingival toutes les protéines présentes dans le sérum correspondant, c'est-à-dire :

- albumine
- alpha I antitrypsine
- ceruloplasmine
- Haptoglobine
- bétalipoprotéine
- gamma A globuline
- gamma G globuline
- sidérophiline

VIA...

(Voir tracé n° 4) - PLANCHE A

Résultats électrophorétiques

Taux protéique : 40 g./l. On peut mettre en évidence :

- | | |
|---------------------|--------------------------|
| - gamma G globuline | - alpha 1 antitrypsine |
| - albumine | - alpha 2 macroglobuline |
| - sidérophiline | |
| - haptoglobine | |

Compte tenu de la concentration, la composition protéique est identique à celui du sérum.

FIN...

(Voir tracé n° 5) - PLANCHE A

Femme de 33 ans.

Prend la pilule contraceptive

Gingivite hypertrophique avec ostéolyses importantes - cul-de-sac très profond.

Prélèvement au niveau de 1 | 1

Résultats électrophorétiques.

Concentration identique à celle d'un sérum.

Toutes les protéines sériques sont retrouvées, y compris les bétalipoprotéines et les alphalipoprotéines.

On voit donc:

- | | |
|---------------------|---------------------------------|
| - albumine | - Haptoglobine |
| - alphalipoprotéine | - α 2 macroglobuline |
| - sidérophiline, | |
| - bétalipoprotéine | |
| - gammaglobuline. | |

Taux protéique : 50 g./l.

GR...

(Voir tracé n° 6) - PLANCHE B

Femme 48 ans.

Parodontite au niveau du groupe incisif avec parodontolyse au niveau molaire.

Prélèvement fluide au niveau de 3.

Résultats électrophorétiques

Composition protéique plus faible que celle d'un sérum.

Taux protéique : 40 g./l.

On retrouve les mêmes protéines que dans le sérum.

- albumine
- alpha I lipoprotéine
- ceruloplasmine
- siderophile
- gammaglobuline.

GOUT...

(Voir tracé n° 7) - PLANCHE B

Homme 65 ans

Parodontolyse à la phase terminale

Résultats électrophorétiques.

On retrouve toutes les protéines du sérum :

- Albumine
- Alpha 1 glycoprotéine
- naptoglobine
- Béta lipoprotéine
- Ceruloplasmine
- Sidérophiline
- Gammaglobuline

Taux protéique : 40 g./l.

BOU...

(Voir tracé n° 8) - PLANCHE B

Femme 65 ans.

Parodontolyse généralisée avec hypertrophies gingivales importantes.

On pratique les prélèvements de fluide gingival au niveau des incisives supérieures.

Résultats immunoélectrophorétiques : on trouve des taux protéiques de 20 g./l.

La composition protéique est identique à celle d'un sérum, compte tenu de la concentration. On distingue entre autres :

- albumine
- sidérophiline
- gammaglobuline

CHI...

(Voir tracé n° 9) - PLANCHE B

Homme de 48 ans.

Gingivite tartrique avec ostéolyse débutante.

Résultats immunoélectrophorétiques : on trouve des taux protéiques de 20 g./l. environ. La composition protéique est identique à celle d'un sérum, compte tenu de la concentration.

On trouve entre autres :

- albumine
- sidérophiline
- gammaglobuline.

Madame HOH...

(Voir tracé n° 10) - PLANCHE B

Femme 38 ans,

Psychopathe, parodontolyse débutante par gingivite tartrique non soignée.

Résultats : taux protéique 50 g./l.

Toutes les protéines sériques sont retrouvées.

On trouve :

- | | |
|------------------------|--------------------------|
| - albumine | - haptoglobine |
| - alpha I lipoprotéine | - alpha 2 macroglobuline |
| - sidérophiline | |
| - bêta lipoprotéines | |
| - gammaglobuline | |

Madame MOU...
Femme 38 ans,

(Voir tracé n° 11) - PLANCHE B

parodontolyse, avec gingivite inflammatoire

Prélèvements au niveau de 4 5

Résultats : Toutes les protéines sériques sont retrouvées.

On trouve :

- albumine
- sidérophiline
- bêta lipoprotéines
- gammaglobuline.
- haptoglobine

Taux protéique : 10 g./l.

Monsieur ROC...
Homme 65 ans,

(Voir tracé n° 12) - PLANCHE B

parodontolyse généralisée.

Septicité buccale importante.

Résultats : toutes les protéines sériques sont retrouvées.

On trouve :

- albumine
- sidérophiline
- bétalipoprotéines
- gammaglobuline.

Taux protéique : 20 g./l.

TABLEAU RECAPITULATIF DES RESULTATS

N° Ex périen ce	TAUX PROTEIQUE	Albu mine	Glyco proté ine	Hapto globi ne	2 M	Sidé- rophi line	β 1 A β 1 C	γ A	γ G
1	10 g. / 1.	S				S		?	S
2	30 g. / 1.	S	S	S	S	S		S	S
3	40 g. / 1.	S	S	S	S	S	S	S	S
4	40 g. / 1	S	S	S	S	S	?	?	S
5	50 g. / 1.	S	S	S	S	S	S	S	S
6	40 g. / 1.	S	S	S	?	S	?	S	S
7	40 g. / 1.	S	S	S	S	S	S	S	S
8	20 g. / 1.	S				S		?	S
9	20 g. / 1.	S				?			S
10	50 g. / 1.	S	S	S	S	S	S	S	S
11	10 g. / 1.	S		S	?	S		?	S
12	20 g. / 1.	S		S	?	S		?	S

Par "S" on entend des proportions comparables au sérum.

Les différents liquides ne diffèrent que par la concentra-
tion protéique totale et correspondent toujours à des sérums plus
ou moins dilués.

D I S C U S S I O N

Quand on étudie de façon comparative la composition protéique du fluide gingival normal obtenu dans les conditions qui ont été décrites, c'est-à-dire les prélèvements faits sur des gencives saines et les prélèvements faits sur des cas pathologiques, cette comparaison fait ressortir plusieurs points intéressants.

Le premier point réside dans la composition même des liquides pathologiques; ils sont tous identiques au sérum, dans tous les liquides étudiés; chaque fois que la concentration était suffisante, nous avons retrouvé toutes les protéines présentes dans le sérum, y compris les macromolécules. Tout se passe comme s'il y avait un véritable effondrement de la barrière épithéliale gingivale. Le liquide normal, lui, fait apparaître une composition pratiquement identique à celle du sérum sanguin, mais avec les différences suivantes :

- La teneur protéique est extrêmement faible, elle est de l'ordre de celle que l'on trouve dans le liquide céphalo-rachidien par exemple, c'est-à-dire de l'ordre de 0,20/1000.

- La composition est, par contre, très différente de celle du liquide céphalo-rachidien puisque, comme nous venons de le dire, elle se rapproche de celle du sérum. En effet, le rapport albumine/Gamma G globuline est pratiquement identique à celui du sérum, c'est-à-dire de l'ordre de 4, alors que dans le liquide céphalo-rachidien, il est au contraire très élevé, de l'ordre de 7 à 8.

Cette différence étant due au fait que, vraisemblablement, il n'ya pas en fait de filtration protéique vraie mais simplement une sorte de transsudation sérique du même type de ce qui se passe dans les liquides d'ascite par exemple.

En somme, on peut conclure que la barrière qui existe entre l'épithélium gingival et le milieu intérieur n'a pas de fonction filtrante et n'a pas également de retentissement sur une sélectivité quelconque de filtration des protéines en fonction de leurs poids moléculaires, par exemple comme cela se passe dans le liquide céphalo-rachidien, dans le glomérule rénal, etc...

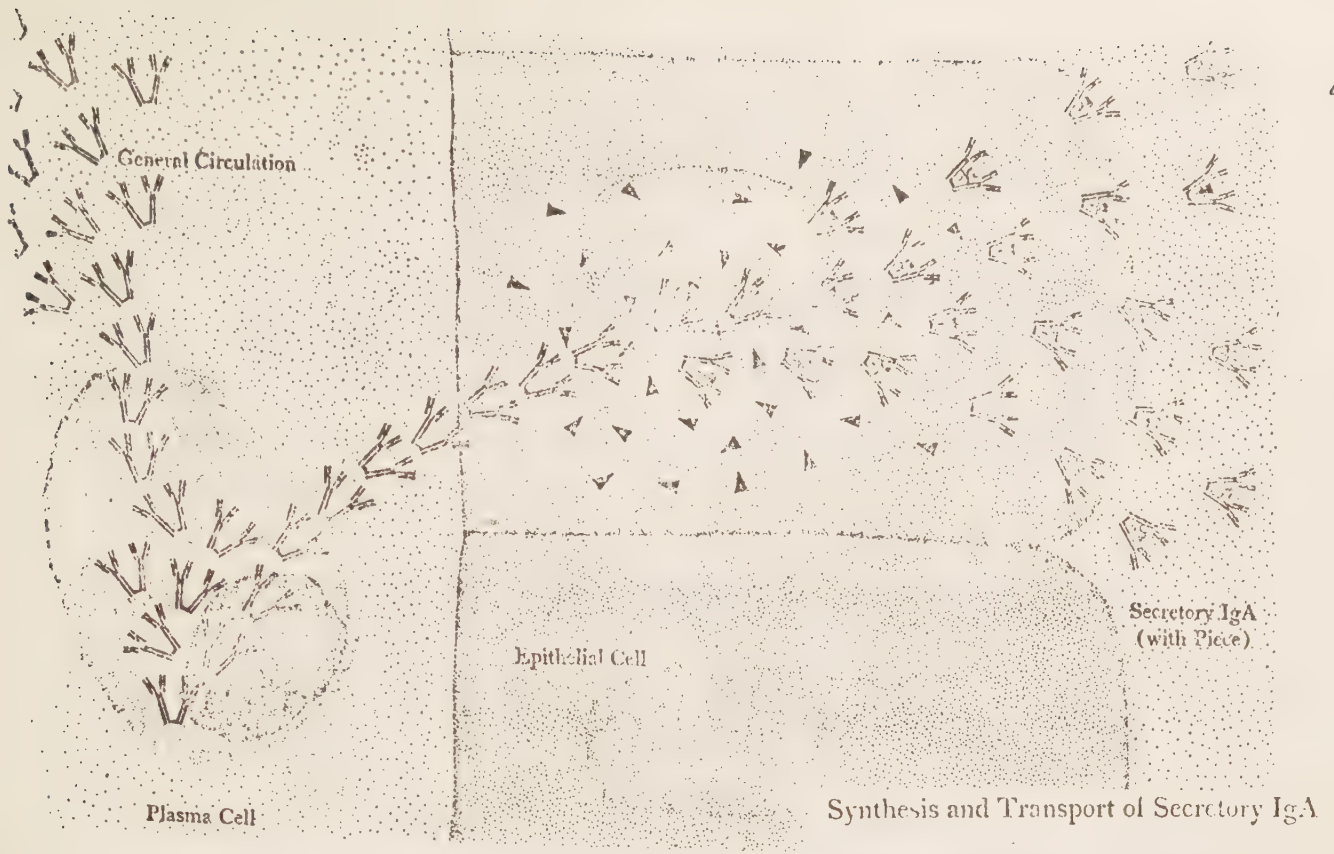
Par ailleurs, nous avons pu vérifier que nous ne trouvions pas de quantité détectable de gamma A globuline, compte tenu des concentrations; ceci est normal. Nous n'aurions pas pu trouver également de gamma A globulines dans le sérum aux concentrations auxquelles nous sommes arrivés qui sont relativement faibles. Par contre, nous les aurions trouvées dans les liquides différents comme la salive, les sécrétions bronchiques, le suc intestinal.

Cela tend donc à démontrer que, contrairement à ces liquides précédents, il n'y a pas de gamma A globulines d'origine épithéliale dans le fluide gingival. Cette constatation est importante. Cela veut donc dire qu'il n'y a pas, comme au niveau des autres tissus épithéliaux (parotidiens, bronchiques, intestinaux, etc...), de fonctions sécrétoires de gamma A globulines et donc pas, vraisemblablement, de pièces de transport de gamma A globulines. On sait, en effet, que ce processus qui commence très tôt, dès la vie utérine, est le processus électif de défense immunologique de ces épithéliums. La pièce de transport ou pièce sécrétoire (transport piece ou secretory piece de BIENNENSTOCK) est un élément indispensable à la formation des gamma A globulines sécrétoires. Voir schéma. Page 44.

Il semble qu'au niveau de l'épithélium gingival, le seul processus immunologique provienne, non pas de l'épithélium gingival, mais de la salive qui apporte, dans le milieu buccal, ces gamma A globulines sécrétoires en provenance de la parotide. Il nous a été impossible de doser la partie caractéristique de ces gamma A globulines : la pièce sécrétoire ou pièce de transport (transport piece ou secretory piece de

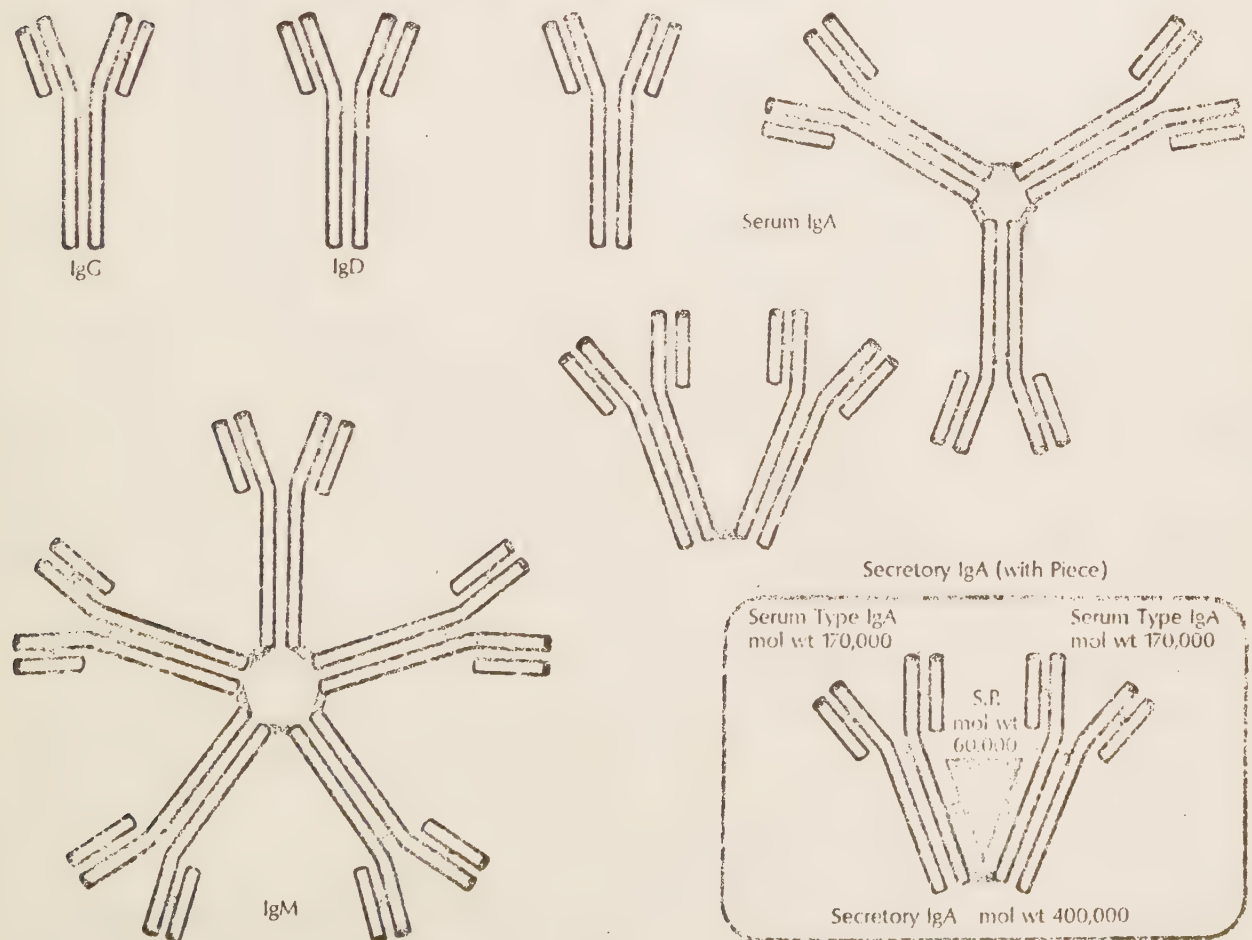
BIENNENSTOCK) car nous n'avions pas en notre possession les immuns sérums correspondants; mais chaque fois que, dans un liquide qui contient ces gamma A globulines sécrétoires, la teneur en gamma A globulines est considérablement augmentée par rapport aux gamma G globulines.

Comme dans le fluide gingival, nous avons pu doser parfaitement les gamma G globulines et que nous n'avons pu doser les gamma A globulines, cela indique donc que, s'il y a des gamma A globulines, il n'y en a pas plus dans le sérum. On peut donc affirmer qu'il n'y a pas de gamma A sécrétoires.



THE GAMMA A GLOBULINS: FIRST LINE OF DEFENSE

The Structure of Immunoglobulins



Comparative structures of the immunoglobulins are schematized. The IgG and IgD are seen as simple monomers, each with two light and two heavy polypeptide chains. Serum IgA is found in this form, but it frequently exists in the pictured dimer and

trimer forms also, particularly in pathologic states. The large 19S IgM is visualized as a pentamer (as proposed by Miller and Metzger), while secretory IgA is seen as a dimer to which secretory piece has been added.

C O N C L U S I O N S

Le fluide gingival se présente comme un liquide qui s'écoule du sillon gingivo-dentaire; il a pu être recueilli sur des gencives cliniquement saines au moyen de papiers filtres et, dans les cas de gencives pathologiques, au moyen de catheters en matière plastique.

L'étude des protéines de ces prélèvements a pu être réalisée grâce à l'immuno-diffusion radiaire et à l'immuno-électrophorèse. L'examen des résultats fait apparaître plusieurs points particuliers.

En ce qui concerne les prélèvements faits sur des parodontes sains, il apparait que les composants protéiques sont les mêmes que ceux du sérum sanguin et il n'existe qu'une différence quantitative avec le sérum sanguin : ainsi la teneur protéique est très faible, de l'ordre de 0,20/1000, mais le rapport albumine/gamma G globuline est identique à celui du sérum. Ceci tend donc à démontrer qu'il n'y a pas de filtration protéique vraie mais simplement une transsudation sérique. Par ailleurs, on ne retrouve pas, dans le fluide gingival, de quantités détectables de gamma A globulines, alors qu'on en trouve dans certaines sécrétions d'origine épithéliale comme la salive ou le suc intestinal, par exemple. Ceci démontre donc qu'il n'y a pas de gamma A globulines d'origine épithéliale et, par conséquent, au niveau de l'épithélium gingival, il n'existe pas de "pièces de transport" de gamma A globulines qui sont des éléments indispensables à la production de gamma A globulines sécrétoires. L'épithélium gingival ne possède donc pas de processus immunologique de défense faisant appel aux gamma A globulines sécrétoires, comme cela se passe au niveau de certains autres épithéliums.

Enfin, les résultats des prélèvements faits sur des gencives pathologiques montrent que les liquides pathologiques étudiés ont les mêmes composants protéiques que le

sérum sanguin; quel que soit le degré d'atteinte parodontale, on a retrouvé toutes les protéines présentes dans le sérum sanguin, y compris les macromolécules. Tout se passe comme s'il y avait un véritable effondrement de la barrière épithéliale gingivale.

Vu, le Directeur de l'U.E.R. Le Président de la thèse,
des Sciences Odontologiques,

R. VINCENT

A. BERTOYE

VU et permis d'imprimer
LYON, le 23 Octobre 1972.

Le Président de l'Université Claude-Bernard,
Pour le Président, le 1er Vice-Président,
Président du Comité de Coordination des
Etudes Médicales,

R. TOURAINÉ

P L A N

- Rappel historique des études précédentes faites sur le fluide gingival.
- Rappel anatomique et histologique du sillon gingival.
- Eléments de physiopathologie parodontale.
- Composition du fluide gingival.
 - . Les différentes théories de l'explication du mécanisme de la production du fluide gingival.
 - . Aspects physiologiques du fluide gingival.
 - Rôle positif du fluide gingival.
 - Rôle négatif du fluide gingival
- Les moyens d'étude.
 - . Recueil du fluide gingival.
 - . Méthode d'étude des protéines.
 - L'immunoélectrophorèse
 - Etude de certaines protéines par immuno-diffusion radiaire.
- Résultats.
 - . Résultats des prélèvements dans les cas pathologiques.
 - . Résultats des prélèvements concernant des gencives cliniquement saines.
- Discussion
- Conclusions.
- Bibliographie.

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - AISENBERG M.S. - AISENBERG A.D.
Hyaluronidase in periodontal disease.
Oral Surg. oral med. and oral path. 4-31 - 1951.
- 2 - ARNOLD R. - LUNSTAD R. - BISSADA N. - STAUARD R..
Alterations in crevicular fluid flow during healing
following gingival surgery.
J. Periodont. Rés. 1-303 - 1966.
- 3 - BISSADA N.F. - SCHAFFER E.M. - HAUS E.
Circadian periodicity of human crevicular fluid flow.
J. Periodont 38:36-40 - 1967.
- 4 - BANG J. - CIMASONI G. - HELD A.J.
Beta glucuronidase correlated with inflammation in the
exudate from human gingiva.
Archs. oral. Biol. vol. 1515. P. 445-451 - 1970.
- 5 - BANG - CIMASONI G.
Total protein in human crevicular fluid.
Journal of dental research. Vol. 50 n° 6 Part. 2 - 1971.
- 6 - BJÖRN A. - KOCH G. - LINDHE J.
Evaluation of gingival fluid measurements.
Odont. Rev. 16-300-307 - 1965.
- 7 - BLACK G.V.
The fibers and glands of the periodontal membrane.
Dental Cosmos 41 - 101 - 1899.
- 8 - BLACK G.V.
Special dental pathology.
Ed. 2 Médico dental Publishing C° - Chicago P. 20 - 1920.
- 8 - BOODECKER C.F.
bis Dental Erosion : its possible causes and treatment.
Dental Cosmos 75 - 1056 - 1933.
- 9 - BRANDTZAEG - WALLACE V. - MANN Jr.
A comparative study of the lysozyme activity of human
gingival pocket fluid, serum and saliva.
Act. Odont. Scand. 22 - 441-455 - 1964.
- 10 - BRANDTZAEG
Immunochemical comparison of proteins in human gingival
pocket fluid, serum and saliva.
Arch. Oral. Biol. 10 - 796-803 - 1965.
- 11 - BRANDTZAEG - KRAUS F.
Autoimmunity and periodontal disease.
Odontol. Tidskrift - 73,285 - 1965.

- 12 - BRANDTZAEG P.
Local factors of resistance in the gingival area.
J. periodont. Res. 1,19-42 - 1966.
- 13 - BRILL N. - KRASSE B.
The passage of tissue fluid into the clinically healthy
gingival pocket.
Act. Odonto. Scand. 16,233 - 1958.
- 14 - BRILL N.
Influence of capillary permeability on flow of tissue fluid
into gingival pockets.
Acta Odonto. Scand. 17,11 - 1959.
- 15 - BRILL N. - KRASSE B.
The passage of tissue fluid into human gingival pockets.
Act. Odont. Scand. 17,11 - 1959.
- 16 - BRILL N.
Removal of particles and bacteria from gingival pockets by
tissue fluid.
Acta. Odont. Scand. 17,431-440 - 1959.
- 17 - BRILL N. - BJÖRN
Passage of tissue fluid into human gingival pockets.
Acta Odont. Scand. - 17, 11-21 - 1959.
- 18 - BRILL N. - KRASSE B.
Effect of Mechanical stimulation on flow of tissue fluid
through gingival pocket epithelium.
Acta. Odont. Scand. - 17, 115-130 - 1959.
- 19 - BRILL N.
Effect of chewing on flow of tissue fluid into human
gingival pocket.
Acta Odont. Scand. - 17, 277 - 1959.
- 20 - BRILL N. - BRONNESTAM
Immunoelectrophoretic study of tissue fluid from gingival
pockets.
Acta Odont. Scand. - 18, 95 - 1960.
- 21 - BRILL N.
Gingival conditions related to flow of tissue fluid into
gingival pockets.
Acta Odont. Scand. - 18, 421 - 1960.
- 22 - BRILL N.
The gingival pocket fluid. Studies of its occurrence composi-
tion and effect.
Thesis The Royal Dental College - Copenhagen - 1962.
- 23 - BRILL N.
The gingival pocket fluid.
Acta Odonto. Scand. 20, Supp. 32 - 1962.

- 24 - BROWNE R.M.
A preliminary study of the fluid from the gingival sulcus.
Proc. Roy. Soc. Med. - 55, 486 - 1962.
- 25 - BROWNE R.M.
Some Observations on the fluid from the gingival crevice.
J. Periodont. - 33, 231-237 - 1964.
- 26 - BROWNE R.M.
The gingival fluid of the rabbit incisor (abstra).
J. Dent. Rest. - 43, 946 - 1964.
- 27 - CARRARO J.J. - MILSTEIN S. - SZNAJDER N. - ZDROJEWSKI D.
Electro foresis en agar del fluido gingival de encias
normales.
Rev. Asoc. Odont. Argent. - 52,77 - 1964.
- 28 - CHAPUT.A
Stomatologie.
Ed. Medicales - Flammarion - 1967.
- 29 - CIMASONI G. - FIORE-DONNO G. - HELD A.J.
Mucopolysaccharides in human epithelial reattachement.
Helv. Odont. Acta. - 7, 60 - 1963.
- 30 - CIMASONI G.
Histological and histochemical features of rat molar
papillae prepared with the brain technique.
Helv. Odont. Acta. - 8, 103 - 1964.
- 31 - CIMASONI G.
Qualitative and quantitative studies of the gingival
secretion.
Deutch Zahnaerzth. - 2, 24-112 - 1969.
- 32 - COLLINS A.A. - GAVIN J.B.
An evaluation of the antimicrobial effect on the fluid
exudate from clinically healthy gingival crevice.
J. Perio. - 32, 99 - 1961.
- 33 - COWLEY G.C.
Application of fluorescent protein tracing to the study
of gingival inflammation.
J. Dent. Rest. - 43, 947 - 1964.
- 34 - COWLEY G.C.
Fluorescence study of crevicular fluid.
J. Dent. Res. - 45, 655-661 - 1966.
- 35 - DEWAR M.P.
Observations of the composition and metabolism of normal
and inflammed gingivae.
J. Periodont. - 26, 29 - 1955.
- 36 - EGELBERG J.
Cellular elements in gingival pocket fluid.
Act. Odont. Scand. - 21, 283 - 1963.

- 37 - EGELBERG J.
Diffusion of histamine into the gingival crevice and through the crevicular epithelium.
Acta. Odont. Scand. - 21, 271 - 1963.
- 38 - EGELBERG J.
Gingival exudate measurements for evaluation of inflammatory changes of the gingivae.
Odont. Rev. - 15, 381-398 - 1964.
- 39 - ENGEL M.B.
Water soluble mucoproteins of the gingiva.
J. Dent. Res. - 32, 779 - 1953.
- 40 - FINE J.M. - ROPARTZ C.
Techniques d'électrophorèse de zones. Applications à l'étude des protéines sériques.
Editions de la Tourelle - Saint Mandé (94) 3e tr. 1968.
- 41 - GAMBLE J.L.
Chemical anatomy, physiology and pathology of extracellular fluid.
Harvard Univer. Press. Cambridge, Mass. - 1947.
- 42 - GENCO R.J.
Immunoglobins and periodontal disease
Journal of periodontology. Vol. 41 n° 4 p. 196-201 April 1970.
- 43 - GRAHAM SMITH J.Jr. - PETER M.D. - BURCK M.D. - ROSETT Theodore - FRANKLIN CHURCH M.D.
Enzymes in blister fluid. The international Academy of Pathology.
Vol. 16 - n°2, 247 - 1967.
- 44 - GREEN L.H.
Quantitative determination of antibacterial activity in the rabbit gingival sulcus.
Arch. Oral. Biol. 95, 491-502 - 1970.
- 45 - GREVERS A.
Crevicular fluid.
Nederl. T. Tandhoelk - 77, 134-137 - 1970.
- 46 - GUFSTASON G.T. - NILSON
Fibrinolytic activity in fluid from the gingival crevice.
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. - 106, 277 - 1961.
- 47 - HANSON L.A.
Aspects of the absence of the IgA system. In "Gamma globulins"
Ed. by Killander J. Nobel symposium 3.
Almqvist and Wiksell Stockholm p.141-151 - 1968.
- 48 - HARA K. - IMAGAWA Y. - ARAYA S.
Carbohydrate in pus and exudate from gingival pockets.
Bull. Tokyo med. dent. Univ. 12, 325 - 1965.

- 49 - HARVEY P.M.
Eliminations of extraneous material from the gingival crevice.
J. Periodont. - 33, 231 - 1962 .
- 50 - HASEGAWA K.
Biochemical study on gingival fluid. Lactic acid in gingival fluid.
Bull. Tokyo Med. and Dental Univer. - 14 (3) 359-372 - 1967 .
- 51 - HIGASHI T. - SUSUKI S. - NAKAYAMA F. - YABA M.
Study on I-131 Adsorption at human teeth neck (in japanese).
Radioisotopes - 10, 329-333 - 1961 .
- 52 - ISHIZA Y.
On the determination of lactic acid in the gingiva of the periodontal diseases (in japanese).
Nihon univ. dent. J. 40, 477-483 - 1966 .
- 53 - ISHIKAWA - CIMASONI G.
Alkaline phosphatase in human gingival fluid and its relation to periodontitis.
Arch. Oral. Biol. Vol. - 15, P. 1401-1404 - 1970 .
- 54 - ISHIKAWA - CIMASONI G. - AHMAD-ZADEH C.
Possible role of lysosomal enzymes in the pathogenesis of periodontitis. A study on cathepsin D in human gingival fluid.
Arch. Oral Biol. Vol. 17, p. 111-117 - 1972 .
- 55 - KASLICK R.S.
Ultra micro method for the collection of gingival fluid and quantitative analysis of its sodium content.
J. Dent. Res. 47, 1192 - 1968 .
- 56 - KRASSE B. - EGELBERG J.
The relative proportions of sodium, potassium and calcium in gingival pocket fluid.
Act. Odont. Scand. 20, 143-152 - 1962 .
- 57 - KONNO H. - IMAGAWA Y. - ARAYA S.
The paperchromatographic analysis of the exudate from the periodontal pocket. The bulletin of Tokyo medical and dental university. Vol. 10 n° 3 p.397-428 - 1963 .
- 58 - LAW D.B. - BERG M. - FOSDICK L.S.
Chemical study in periodontal disease.
J.D. Res. 25, 231 - 1946 .
- 59 - LENG A.
The local metabolism in periodontal disease.
J. Dent. Med. 3, 3-5 - 1948 .
- 60 - LÖE H.
Physiological aspect of the gingival pocket.
Acta odont. Scand. 19, 387 - 1961 .

- 61 - LÖE H.
The physiology of the gingival pocket.
Dent. prac. Dent. rec. 14, 205-213 - 1964.
- 62 - LÖE H. - PEDERSON Ph.
Absence and presence of fluid from normal and inflamed gingiva.
Periodontics 3, 171 - 1965.
- 63 - LOPEZ V. - GOLDER S.
A new immuno diffusion method for quantitative determination of proteins in biological fluids on a separate application of antibody and antigen to small agar discs.
Clin. Chim.Acta. Vol. 21 - 1968.
- 64 - MANCINI G. - CARBONARA A.O - HEREMANS J.F.
Immuno chemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion.
Immunochemistry 2, 235-246 - 1965.
- 65 - MANN W.V.
The correlation of gingivitis pocket depth and exudate from the gingival crevice.
J. Periodont 34, 379-387 - 1963.
- 66 - MANN W.V.
Electrophoresis of tissue fluid from gingival pockets.
I.A.D.R. (Abstract) 49 - 1963.
- 67 - MANN W.V.
The correlation of gingivitis pocket depth and exudate from the gingival crevice.
J. Periodont 34, 379 - 1963.
- 68 - MANN W.V. - STOFFER H.R.
The identification of protein components in fluid from gingival pockets.
Periodontics 2, 263 - 1964.
- 69 - MASUI Y.
Studies on dehydrogenases in gingiva (in japanese).
J. Japan Stomatol. Soc. 25, 573 - 1958.
- 70 - MAURER H.R.
Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel Electrophoresis.
Edit. Walter de Gruyter - Berlin -New-York - 1971
- 71 - NABIL - F. BISSADA - ERWIN M. - SCHAFFER - HAUS
Circadian periodicity of human crevicular fluid flow.
The journal of periodontology. Vol. 38 n° 1 - 36 - 1967
- 72 - NAGAO M.
Intragingival exudates and dental prosthesis 34,488 - 1967
- 73 - NAGAO M.
Crevicular tissue fluids hypertension.
J. Jap. stomato soc. 34, 126-131 - 1967

- 74 - NAGAO M.
Dental prosthesis and gingival pocket exudates.
J. Jap. stomat. soc. 35, 532 - 1968.
- 75 - NISENGARD R. - BEUTNER E.H. - HAZEN S.P.
Immunologic studies of periodontal disease.
J. Periodont. 39, 329 - 1968.
- 76 - ORBAN J.E.
Gingival crevicular fluid : a reliable predictor of
gingival health?
JPeriodont. 40, 231-235 - 1965.
- 77 - PAUNIO K.V.
Azo dye binding of human gingival fluid at various stages
of gingivitis.
Acta. Odont. Scand. 28, 243-249 - 1970.
- 78 - RATCLIFF P.A.
Permeability of healthy gingival epithelium by microscopically
observable particles.
J. Periodont. 37, 291-291 - 1966.
- 79 - SALKIND D.A - OSHRAIN H.I. - MANDEL I.D.
Observations on gingival pocket fluid.
Periodontics - 1, 196 - 1963.
- 80 - SCHEIDEGGER J.J.
Une micro méthode de l'immuno-électrophorèse.
Int. Arch. Alb. - 7, 103-110 - 1955.
- 81 - SCHULTZ-HAUDT S.D. - BIRBY B.G. - BRUCE M.A.
Tissue destructive products of gingival bacteria from non
specific gingivitis.
J. Dent. Rest. - 33, 625 - 1954.
- 82 - SCHULTZ-HAUDT S.D. - SCHERP H.W.
Production of hyaluronidase and beta glucuronidase by
viridans streptococci isolated from gingival crevices.
J. Dent. Res. - 34, 924 - 1955.
- 83 - SCHULTZ-HAUDT S.D. - WAERHAUG J. - FROM S.H. - ATTRAMDAL A.
On the nature of contact between the gingival epithélium
and the tooth enamel surface.
Periodontics - 1, 103 - 1963.
- 84 - SCHULTZ-HAUDT S.D.
Microbiology of periodontal disease. Biochemical aspects
of periodontal disease.
Int. Dent. J. 24, 398 - 1964.
- 85 - SCHULTZ-HAUDT S.D.
Biochemical aspects of periodontal disease.
Int. J. - 14, 398-406 - 1964.
- 86 - SERRES A.
Essai sur l'anatomie et la physiologie des dents ou
nouvelle théorie de la dentition
Paris, Mequignon, Marvis - 1917

- 87 - STALLARD R.E. - DIAB M.A. - ZANDER H.A.
The attaching substance between enamel and epithelium and the tooth enamel surface.
J. Periodont. 36, 130 - 1965.
- 88 - SOUTH M.A. - COOPER M.D. - WOLLHEIM F.A. - HONG R. - GOOD R.A.
The IgA system studies of the transport and immunochemistry of IgA in the saliva.
J. exp. med. 123, 615-627 - 1966.
- 88 - STILLMAN and Mc CALL J.O.
bis Clinical Periodontia Macmillon C° N.Y.C. p. 31 - 1922.
- 89 - SUEDA T.
On the tissue fluid flowing out in gingival pocket. Total Weight and ninhydrin positive substance.
J. Japan Stoma. Soc. - 29, 269 - 1962.
- 90 - SUEDA T. - IMAGAWA Y. - ARAYA S.
Tissue fluid flowing into gingival pocket. Bull Tokyo. med. Dent. Univ. 12, 159 - 1965.
- 91 - SUEDA T. - CIMASONI G. - HELD A.J.
Histochemical study of human gingival fluid.
Parodontologie 20, 141-147 - 1966.
- 92 - SUEDA T. - CIMASONI G. - HELD A.J.
High levels of acid phosphatase in human gingival fluid.
Arch. oral. Biol. Vol. 12 p. 1205-1207 - 1967.
- 93 - SUEDA T.
The origin of acid phosphatase in human gingival fluid.
Arch. Oral. Biol. 13, 553-558 - 1968.
- 94 - SUEDA T. - BANG J. - CIMASONI G.
Collection of gingival fluid for quantitative analysis.
Journal of dental research. Vol. 48 n° 1 - 1969.
- 95 - SULSER G.F. - BRENNING G.H. - FOSDICK L.S.
Chemical study in periodontal disease.
J. D.Res. 18, 355 - 1939.
- 96 - TAKAMORI K.
The growth stimulating factors for lactobacillus appeared in tissue fluid from gingival crevice.
The Bulletin of Tokyo medical and dental university.
Vol. 10 n° 4 - 533 - 1963.
- 97 - THILANDER H.
The effect of leukocytic enzyme activity on the structure of the gingival pocket epithelium in man.
Acta Odont. Scandinav. 21, 431-451 - 1963.
- 98 - THONARD J.C. - SCHERP H.W.
Histochemical demonstration of acid muco polysaccharides in human gingival epithelial intercellular spaces.
Arch. Oral Biol. 7, 125 - 1962.

- 99 - TOLLER P.A.
Protein substances in odontogenic cyst. Fluid.
Brit. Dent. J. 128, 317-322 - 1970.
- 100 - TOMASI T.B. - TAN E.M. - SALOMON A - PRENDERGAST R.A.
Characteristics of an immune system common to certain
external secretions.
J. Exp. med. 121, 101-124 - 1965.
- 101 - TOTO P.D. - SICHER H.
The epithelial attachment.
Periodontics 2, 154 - 1964.
- 102 - TROTT J.R.
An investigation into glycogen content of the gingivae.
Dent. Pract. 7, 238 - 1957.
- 103 - WAERHAUG J.
The gingival pocket.
Odont. Tidskr. Suppl. 1 - 1952.
- 104 - WAERHAUG J.
The source of mineral salts in subgingival calculus.
J.D. Res. 34, 569 - 1955.
- 105 - WAERHAUG J. - STEEN E.
The presence of absence of bacteria in gingival pockets
and the reaction in healthy pockets to certain pure
culture.
Odont. Tidskrift 60 Supp. 1 - 1952.
- 106 - WEINSTEIN E. - MANDEL I.D.
The fluid of the gingival sulcus.
Periodontics Vol. 2 number 4, 147-153 - 1964.
- 107 - WEINSTEIN E. - MANDEL I.D. - SALKIND A. - OSHRAIN H.I.-
PAPPAS G.D.
Studies of gingival fluid.
Periodontics 5, 161-166 - 1967.
- 108 - YOKOMIZO I - YAMADA H. - AONO M. - ONO T.
Paper chromatographic studies of amino acid in the
dental calculus.
J.J.S.S4, 202 - 1955.

